



Apartado de Correos / P.O. Box 44
28210-Valdemorillo (Madrid, Spain)
☎ (34) 91 897 46 16 Fax: (34) 91 897 46 41
E-mail: microkit@microkit.es
Web: <http://www.microkit.es>
Blog: www.medioscultivo.com

Empresa Certificada bajo Norma ISO 9001 desde 1997

MCC P/A	COSMETIKIT®	DRY PLATES®	MUGPLUS
CRIOTECA®	CHROMOSALM	DESINFECTEST®	CCCNT
PLAQUIS®	KITPRO-PLUS	CROMOKIT®	MBS
M-IDENT®	SEILAGUA®	SALMOQUICK	AIRESANO
NEOGRAM	ENVIROCOUNT		

Puntos críticos en la detección de *Legionella pneumophila*: GVPC y BCYE Broth

La detección y enumeración de *Legionella spp.* y de *Legionella pneumophila* según Norma ISO 11731, tiene varios **puntos críticos** que la convierten en un protocolo problemático, que acaba en su no-detección por parte de numerosos laboratorios (sensibilidad media del 41,61% según los servicios intercomparativos SEILAGUA®), o al menos en la obtención de recuentos cuyo límite inferior de cuantificación es a menudo superior a nada menos que 200-800 ufc/litro, y en algunos laboratorios no acreditados, de hasta 10^5 ufc/litro. Aunque hemos plasmado estos puntos críticos en nuestro protocolo de detección y recuento de *L.pneumophila* en aguas (ref: PNT-AG-007), hemos decidido compartir con todos los laboratorios que lo deseen dichos problemas de detección:

El **primero** de dichos puntos críticos es la no-revitalización de las células de *Legionella* que, sobre todo tras los shocks de hipercloración y tratamientos preventivos actuales (motivados por los numerosos brotes de años anteriores), suelen encontrarse en estado subletal. Se busca *Legionella* en agua para evitar su proliferación en el aire (donde se convierte en patógena por respiración), cuando su hábitat real no es el aire ni siquiera es el agua: es el biofilm, de modo que las formas planctónicas son sólo formas de dispersión de la especie.

Por ello hace ya tiempo que MICROKIT diseñó una modificación del Agar GVPC en forma de caldo revitalizante selectivo y concentrado para añadir a 1 litro de agua de refrigeración, en kit de tubos para añadir a 1 l de agua con torundas de rascado de biofilm (ref: RPL330) o bien en tubos sin las torundas para añadir a 1 l de agua (ref: TPL016). Este medio resulta costoso por su elevada concentración de antibióticos, dado que se añade a 1 l de agua. Por ello MICROKIT ha rediseñado el Agar BCYE en forma de caldo revitalizante no selectivo y concentrado (ref: TPL017) para añadir a 1 litro de agua presuntamente potable o de baja carga microbiana, ya que la escasa flora acompañante en ellas permite revitalizar las *Legionella* sin necesidad de agentes selectivos.

Tanto el tubo de caldo GVPC como el tubo de caldo BCYE se emplean de la misma manera:

1-Añadir el contenido del tubo (heterogéneo por el carbón granulado que absorbe los residuos de desinfectantes, así como los metabolitos generados) recién agitado a 1 litro de muestra de agua, volver a agitar y dejar actuar durante 18-24 horas a temperatura ambiente (18-25°C). No incubar a 35-37 °C, o la posible población de *Legionella* se multiplicaría, impidiendo realizar posteriores recuentos de la flora original. El retraso de 1 día en el análisis se compensa holgadamente con la rapidez de crecimiento posterior en placa de las *Legionella* bien revitalizadas.

2-Verter el agua con cuidado de que no caiga el carbón, sobre los embudos de filtración y realizar el análisis siguiendo el protocolo habitual.

El uso del caldo revitalizante aumenta la sensibilidad en la detección de *Legionella* ¡hasta un 85%! , como se demuestra en los resultados de los servicios intercomparativos SEILAGUA®.

El **segundo** de los puntos críticos del protocolo habitual de *Legionella* es que se filtra 1 litro completo en una sola membrana, lo cual genera desconfianza sobre si la membrana habrá resistido o se habrá fisurado sin percibirse, pasando las células al líquido eluyente que no se analiza, y proporcionando por tanto resultados falsamente negativos o bajos. Y aunque no fuera así, el efecto estrés producido en las células que hayan quedado retenidas desde el principio en el filtro, tras un litro filtrado, degenera también en una importante merma de la sensibilidad. La solución es filtrar 4 tandas de 250 ml en sendas membranas. Aunque esto aumenta el trabajo y la cantidad de membranas y placas necesarias, asegura una muy superior recuperación, como demuestran los participantes de los servicios intercomparativos SEILAGUA® que aplican este consejo.

Para paliar un poco este aumento del gasto y ahorrar placas, podemos añadir dos membranas por placa de 90 mm si nuestro sistema de filtración no ocupa toda la superficie de la membrana y podemos así colocar las dos membranas solapadas sin que las dos zonas filtradas queden superpuestas. De este modo sólo necesitamos dos placas por litro de agua.

El **tercer** punto crítico que debemos controlar (y nos debemos ahorrar en aguas con poca flora acompañante, como son las aguas potables) es el shock ácido que elimina la flora competitiva pero también puede eliminar buena parte la viabilidad de la *Legionella*, sobre todo si se prolonga algunos segundos más de lo necesario.

El **cuarto** punto crítico es el medio de cultivo GVPC Agar, que resulta tan selectivo para especies distintas a la *Legionella* como incluso para la *Legionella*. De hecho, utilizando cepas cuantitativas certificadas (ref: MKTN12821), podemos verificar que los recuentos de *Legionella* en BCYE, se dividen por 10 (bajan un logaritmo) con las mismas cepas si empleamos GVPC. Por ello proponemos en aguas de baja carga microbiana, que de las dos placas empleadas por litro, siguiendo el consejo del punto 2, una sea de GVPC pero la otra sea de BCYE, que nos alertará si la selectividad del primero ha sido excesiva. Por otra parte no todas las placas preparadas de medios para *Legionella* funcionan correctamente, de hecho es muy difícil encontrar el truco por el cual un medio de la composición de la ISO 11731 se pueda convertir en un buen medio. Por ello recomendamos el uso de nuestras nuevas placas de GVPC Agar (ref: PPLS30) y de BCYE Agar (ref: PPLS31), de máxima recuperación, prescindiendo de medios deshidratados y de placas baratas. En cuanto al tercer medio donde no crece *Legionella*, nos parece un despilfarro utilizar BCYE-Cys o incluso Agar sangre, cuando para su no-crecimiento se puede usar el mismo Nutrient Agar que en recuento de aerobios, el YEA también llamado PCA-Water (ref: PPL901 en plaquita hermética de larga caducidad, TPL060Z en tubos para fundir y hacerse la placa por siembra en masa, RPL106 en frascos para fundir y hacerse 5-7 placas, DMT152 en polvo deshidratado).

El **quinto** punto crítico es la confirmación de las colonias por métodos serológicos, ya que la inmunofluorescencia ya nadie la usa y se ha puesto de moda utilizar látex, aunque todos sabemos que es la técnica inmunológica menos robusta y que más problemas de sensibilidad y de detección proporciona. Gracias a los avances desarrollados por empresas como la nuestra, en este caso de nuestros compatriotas Vircell, podemos ofrecer al fin una alternativa rápida, de muy bajo coste y máximo rendimiento: los inmunocromatogramas o rapidsticks Virapid *Legionella* (ref: VR002).

Confiamos este documento contribuya a la mejor detección de *Legionella pneumophila* en las aguas de nuestro país y todos los laboratorios sepan agradecer nuestros esfuerzos, haciéndonos pedidos de la mayoría del material que ofrecemos.